TaKaRa

「リアルタイム PCR による遺伝子迅速検出」

蛍光物質を使用して PCR 増幅産物をリアルタイムでモニターし解析するリアルタイム PCR 法は、検出感度が高いこと、従来の PCR 法のようにゲル電気泳動を必要とせず解析が閉鎖系で行えること、結果が数値データとして得られることなど、検査に適した多くの利点を有しています。さらに、装置と試薬さえあれば初心者でも気軽に始められる簡便性、反応開始から数時間で結果判定ができる迅速性、検査で重要視される反応特異性の高さから、現在では食品検査や微生物検査などにおいても一般的手法として普及しつつあります。特に、ターゲット遺伝子に特異的な配列をもつプローブを用いて検出する方法は、近縁種の存在する病原微生物の検出や加工食品での肉種判定などにも利用でき、今後ますます幅広い分野での応用が期待されています。

本冊子では、リアルタイム PCR により病原性微生物や食品関連の遺伝子検出を行った例をご紹介します。

目　次

Ⅰ．　リアルタイム PCR を始めるにあたって・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２

１）　必要な実験器具・装置

２）　基本的な実験操作

３）　実験環境について

Ⅱ．　リアルタイム PCR 実験の概論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９

リアルタイム PCR の原理について

サンプルの希釈方法について

Ⅲ．　厚生労働省通知法に関連したキットのご紹介・・・・・・・・・・・・・・・１６

１）**通知法に収載されたキット**

１－１）腸管出血性大腸菌

１－２）クリプトスポリジウム属・ジアルジア

２）**通知法収載の配列を採用したキット**

２－１）ノロウイルス

２－２）クドア・セプテンクタータ

Ⅳ．　キットを利用した応用例のご紹介・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２１

１）　ネギトロ用マグロからのリステリア菌の検出と菌数の算出

２）　アサリ剥き身またはアジからの *tdh* 遺伝子保有腸炎ビブリオの検出

３）　ドライソーセージの原材料肉を判別

４）　豚挽肉からの食中毒関連遺伝子の検出

Ⅴ．　関連製品一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３１

I. リアルタイム PCR を始めるにあたって

１） 必要な実験器具・装置

リアルタイム PCR は従来の PCR をベースにした技術であり、専用のリアルタイム PCR 装置のほかは、実験器具なども基本的には同じものが使用できます。装置および主な器具類を紹介します。

リアルタイム PCR 装置

リアルタイム PCR 実験を行うには、専用装置が必要です。通常の PCR 装置（サーマルサイクラー）に蛍光検出器を搭載し、コンピュータで制御する形式の装置です。
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* （製品コード TP900）は 96 サンプルを一度に処理できるので、多検体での解析が可能です。検査現場での使いやすさを最優先した食品環境検査用ソフトウェア（日本語版）を搭載しています。

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*
（製品コード TP900）

Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700）は高性能を維持したエコノミータイプのリアルタイム PCR 装置です。48 サンプルを一度に処理できます。

Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*
（製品コード TP700）

反応チューブ、または反応プレート

Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズでは専用の８連チューブをご用意しており、８連チューブには、チューブ、フラットキャップともにそれぞれが８連で連結した 0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）および 0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）、フラットキャップが独立しているので切り離せばシングルチューブとしても利用可能な、独立型フラットキャップ付き８連チューブ 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）があります。コンタミネーション防止のためには、独立型フラットキャップ付き８連チューブをお勧めします。

Thermal Cycler Dice® Real Time *II* では、専用の 96 ウェルプレート（96 well Hi-Plate for Real Time；製品コード NJ400 と Sealing Film for Real Time；製品コード NJ500）、Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* では、専用の 48 ウェルプレート（48 well snap plate；製品コード NJ700 と Flat cap for snap plate；製品コード NJ720）をご用意しています。上記以外のチューブやプレートを使用すると、正常な PCR 反応が行われない他、装置故障の原因となりますので、ご注意ください。

その他、反応液のマスターミックス調製や鋳型の希釈に使用するチューブ類は、通常の PCR/RT-PCR 実験と同様のものをご利用いただけます。

８連反応チューブ

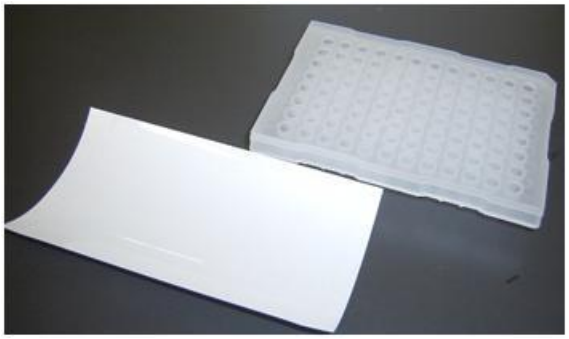
Thermal Cycler Dice® Real Time System 専用の、独立型フラットキャップ付きチューブが８連結したタイプ

・0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (NJ600)

８連反応チューブ

Thermal Cycler Dice® Real Time System 専用の、チューブおよびキャップがそれぞれ８連結したタイプ

・0.2 ml Hi-8-Tube (NJ300)
・0.2 ml Hi-8-Flat Cap (NJ302)

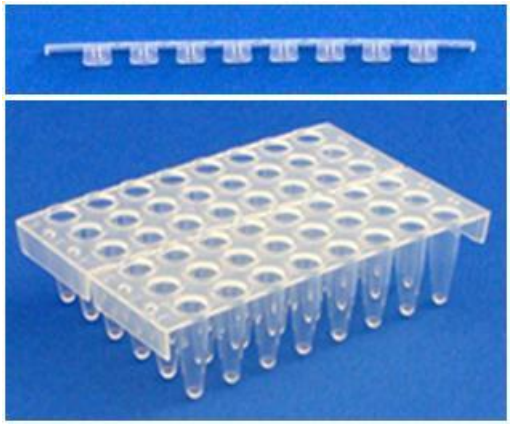


96 ウェルプレート　＆　シール

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* 専用の 96 穴反応用プレートと密閉用シール

・96well Hi-Plate for Real Time (NJ400)
・Sealing Film for Real Time (NJ500)
・Plate Sealing Pads* (9090)

* 96 ウェルプレートに、シールをしっかりと貼り付けるために使用する専用パッド



48 ウェルプレート&キャップ

Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* 専用の 48 穴反応用プレートとキャップ

・48 well snap plate* (NJ700)
・Flat cap for snap plate (NJ720)

* 24 well x 2 枚に切り離して使用可能。

マイクロピペット

今まで PCR 実験で使用されているものをそのままご使用いただけます。使用容量に合わせて数種類そろえておくと便利です。（～10 µl 用、～200 µl 用、～1000 µl 用は多用途に使用可能です。）96 ウェルプレートを多用される場合は、マルチチャンネルピペッターが便利です。
なお、RNA を取り扱う場合は、RNA 実験専用のマイクロピペットをご準備ください。

マイクロピペットの選択例

・ギルソン社のピペットマン（PIPETMAN）
・エッペンドルフ社の容量連続可変ピペット　等

マルチチャンネルピペッターの選択例

・サーモフィッシャーサイエンティフィック社のフィンピペットノーバス マルチチャンネル
・レイニン社の EDP3-Plus　電動マルチチャンネル　　等

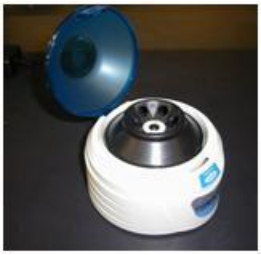
マイクロピペット用チップ

エアロゾルによるコンタミネーションを防止するため疎水性フィルター付きのチップを使用します。リアルタイム PCR はシングルコピーオーダーの鋳型の検出も可能であるため、反応液調製時に鋳型となりうる核酸等が混入しないように細心の注意が必要です。疎水性フィルター付きのチップは各メーカーのマイクロピペットに対応した滅菌済のものが販売されています。

反応チューブ、反応プレート用遠心機

通常の PCR 実験で使用する卓上型の 1.5 ml チューブ用小型遠心機の他に、8 連反応チューブ用の遠心機や反応プレート用の遠心機があると便利です。

反応液を反応チューブやプレートに分注後、チューブ壁などに飛散した反応液をスピンダウンするときに使用します。



卓上型小型遠心機の選択例

主に反応液のマスターミックス調製等で 1.5 ml チューブをスピンダウンするときに使用します。

日本ミリポア（株）のチビタン II

日本ミリポア（株）のチビタン R　等

8 連反応チューブに分注後、スピンダウンするときに使用します。

和研薬（株）のプチはち　等

96 穴反応プレートへ反応液を分注した後のスピンダウンに使用します。

（株）日立ハイテクのマイクロプレート用フラッシュ遠心機 himac CT2Y　等

撹拌機

試料の調製や鋳型の希釈、反応液調製時に溶液を均一にするために使用します。酵素を含む溶液を激しく撹拌すると酵素が失活する恐れがあるので注意が必要です。

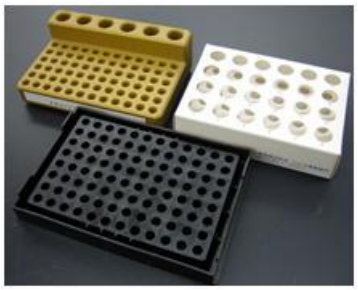
撹拌機の選択例

サイエンティフィックインダストリーズ社 VORTEX-GENIE 2　　等

アイスボックス

発泡スチロール製などのアイスボックスにクラッシュアイスを入れて使用します。反応液調製時に試薬や反応液のチューブを立てて冷却し、試薬の劣化を防ぎます。

チューブスタンド



1.5 ml と 0.2 ml の PCR チューブに対応したものをそろえておくと便利です。

PCR チューブまたは 96 穴プレートに対応したスタンドは、金属製のものを準備すれば、氷上にセットすることで冷却しながら反応液を調製できるのでお勧めです。

パウダーフリータイプ　ディスポーザブル手袋

手袋を着用することで、手の汚れや汗などによるコンタミネーションを防止できます。各種市販品がありますので、お好みに合わせてお選びいただけますが、パウダーフリータイプを推奨します。

その他（必要に応じてご用意いただくと便利です。）

白衣　　：実験エリアごとに着替えることは、コンタミネーションの防止に効果的です。

スリッパ：実験エリアごとに専用の履物を用意することで、コンタミネーションを防止する環境を整えることが可能です。

マスク　：RNA を取り扱う際に、唾液に含まれる RNase がサンプルや反応液に混入することを防止できます。

２）　基本的な実験操作

基本的な実験操作の流れは、次の 5 つのステップです。

１．試料の調製

２．リアルタイム PCR 装置のセッティング　：　装置の取扱説明書に従い準備を行います。

３．反応液の調製

４．リアルタイム PCR 反応開始　：　装置の取扱説明書に従い反応を開始します。

５．結果の解析

３）　実験環境について

菌体の取り扱いには十分に注意し、必要に応じて安全キャビネット内で操作してください。 また、PCR による検出は非常に高感度です。コンタミネーションを防止するために、サンプルの調製から PCR 検出まで次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。
正しい結果を得るために、以下の注意点をご確認ください。

・バイオセーフティ規定を順守する

病原微生物感染が疑われる検体を取り扱う際の検査担当者の安全を目的とします。施設内の該当規則を遵守すると共に、適切なバイオセーフティレベルの実験施設で取り扱ってください。バイオセーフティに関する規定については「国立感染症研究所病原体等安全管理規定」で確認できます。
（http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/　2014 年 12 月 15 日現在）

・核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）のコンタミネーションを防止する

DNase、RNase の混入による核酸の分解防止を目的とします。万一、サンプルやプローブ、プライマーなどの核酸がヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブル手袋の交換およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。

・遺伝子のコンタミネーションを防止する

器具間の核酸クロスコンタミネーションや、増幅産物の混入による誤判定防止を目的とします。PCR による検出は非常に高感度なため、ごく微量な混入でも増幅の原因となります。作業エリアを物理的に隔離し、実験器具や着衣の取り扱いにも注意してください。

●エリア１：反応試薬のみを扱うエリア

リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
（鋳型となる DNA は一切持ち込まない）

●エリア２：検体を扱うエリア

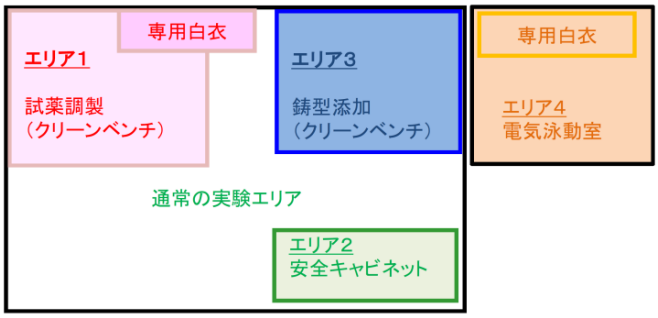
検体の取扱いや DNA 調製を行う。検体のバイオハザードレベルが高い場合、安全キャビネットの設置が理想。

●エリア３：調製済みの高濃度 DNA を扱うエリア

分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

●エリア４：PCR 産物を取り扱うエリア

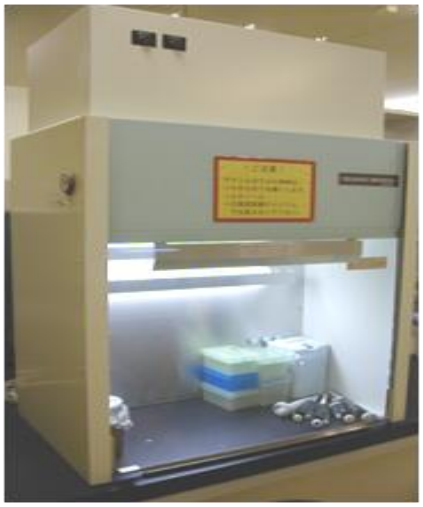
PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合は、エリア 1,2,3 とは異なる別室で行う。



※各エリアの区分けは、部屋ごとの区別でも、一部屋の中で簡易クリーンベンチによる区分けでも問題ありません。

■コンタミネーション防止のポイント

- 操作ごとにエリアを分ける。
- エリアごとにマイクロピペット、チップ、白衣を分ける。
- 疎水性フィルター付きチップを用いる。
- プライマー溶液、反応試薬などを小分けしておく。
- DNA-OFF（製品コード 9036）で、実験台や器具をふき取る。
- 陰性（ネガコン）反応による確認を行う。
- リアルタイム PCR を使用する（電気泳動不要）。



左図の写真のように、クリーンベンチ内にピペットやチップを常設し、使用しない時は UV 照射しておくと便利です。

コンタミネーションが発生すると、実験結果に影響を及ぼすので、事前に可能な範囲で実験環境の整備をしておくことをお勧めします。万一コンタミネーションが発生した場合は、考えられる原因にひとつひとつ対処してください。試薬へのコンタミネーションが疑われるときは、新しいものに取り替える必要があります。実験台や器具類は洗浄を徹底してください。

Ⅱ． リアルタイム PCR 実験の概論

リアルタイム PCR の原理について

リアルタイム PCR 法は、PCR 法に基づいた簡便で迅速な遺伝子検出方法です。反応液の中にあらかじめ蛍光プローブあるいは蛍光色素を添加し、リアルタイムで目的遺伝子の増幅をモニタリングします。リアルタイム PCR 法を用いることにより、PCR 法で必須であった電気泳動（PCR 反応終了後、増幅産物を電気泳動に供してバンドの有無を確認する操作）が不要となり、よりスピーディーで、コンタミネーションによるリスクの低い遺伝子検出を実施できます。

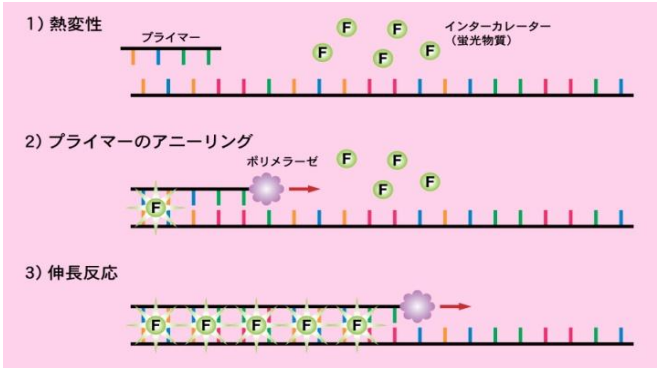
定性解析におけるリアルタイム PCR の利点
- 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- コンタミネーションのリスクが低い

定量解析におけるリアルタイム PCR の利点
- 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- コンタミネーションのリスクが低い
- 広いダイナミックレンジで正確な定量ができる

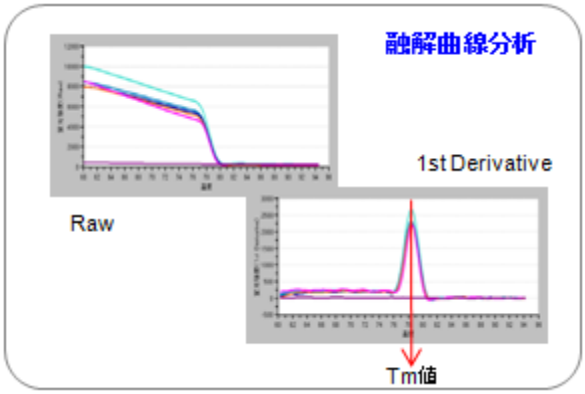
リアルタイム PCR の検出原理には、プローブ法（サイクリングプローブ、TaqMan®プローブなど）とインターカレーター法（SYBR® Green I）があり、ここでは各方法の原理についてご紹介します。

１） インターカレーター法 （SYBR Green アッセイ）

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I）を PCR 反応系に加える方法です。インターカレーターは、PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射により蛍光を発します。この蛍光強度を検出することにより、増幅産物の生成量をモニターできます。また、増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。



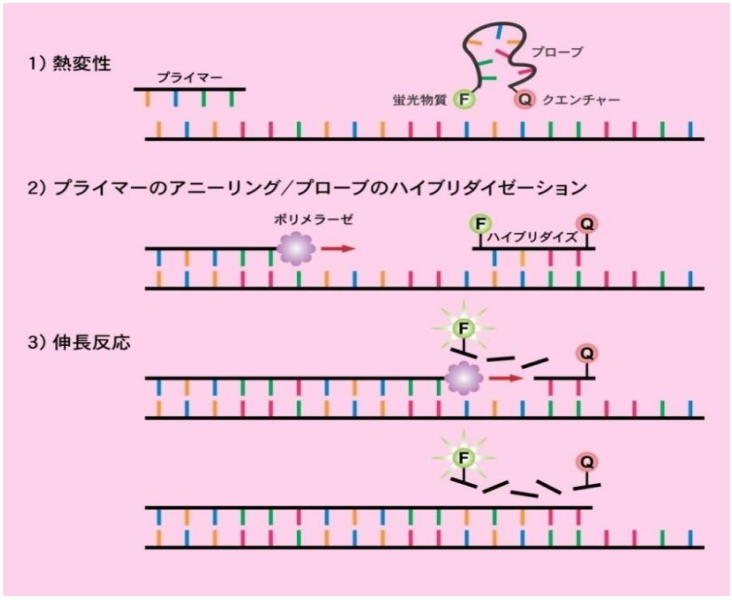
PCR 後に PCR 反応液の温度を徐々に上げてインターカレーターの蛍光シグナルをモニタリングすると、最初は PCR 増幅産物の二本鎖 DNA に結合して蛍光シグナルを発していますが、ある一定の温度に達すると DNA が一本鎖に解離し、蛍光シグナルの急激な低下が確認できます。この変化をプロットしたものが融解曲線であり、一本鎖に解離する温度は融解温度（Tm 値）と呼ばれ、増幅産物の配列に固有の値を示します。融解曲線を 1st Derivative で表示した際のピーク位置が Tm 値です。



２）　蛍光プローブ

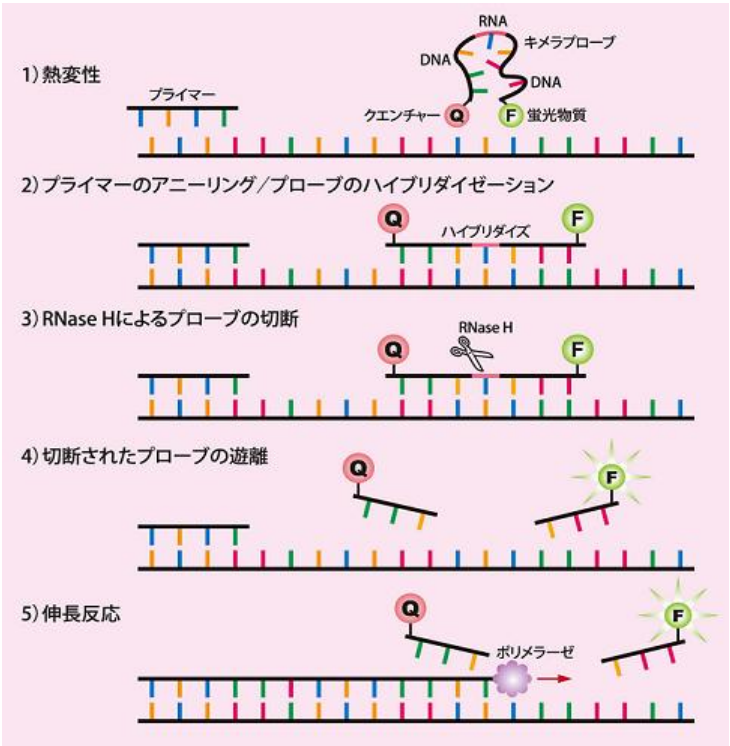
A. TaqMan®プローブ　(Linear Probe の一種)

TaqMan®プローブは、5’末端を蛍光物質で、3’末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドです。このプローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズするように設計されていますが、ハイブリダイズした段階ではプローブ上にクエンチャーが存在するために、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されています。その後の伸長反応ステップで、*Taq* DNA ポリメラーゼのもつ 5’ → 3’ エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズした TaqMan®プローブが分解されることにより、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発するようになります。



B. サイクリングプローブ (Linear Probe の一種)

サイクリングプローブは、RNA と DNA からなるキメラオリゴヌクレオチドで、片方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で修飾されています。インタクトな状態では蛍光を発しませんが、PCR 増幅産物とハイブリッドを形成すると、反応液中に含まれる RNase H により RNA 部分が切断されて蛍光を発します。サイクリングプローブの RNA 付近にミスマッチが存在すると RNase H による切断は起こらないので、非常に配列特異性の高い検出が可能であり、SNPs タイピングなどに最適です。



参考

蛍光物質に関する基礎知識　・・・・

蛍光標識プローブを用いたリアルタイム PCR では、プローブの種類だけでなく蛍光色素の種類も重要である。ほとんどの蛍光標識プローブでは、蛍光物質とクエンチャーを組み合わせ、FRET の原理を利用して検出している。蛍光物質とクエンチャーにはさまざまな種類があり、使用するリアルタイム PCR 装置の励起および検出波長に合ったものを選択する。また、マルチプレックスのリアルタイム PCR を行う際には、各蛍光がクロストークしないように組み合わせに留意する。

蛍光物質は、ある特定の波長の光を吸収して励起状態となり、もとの基底状態に戻るときに吸収したものとは異なる波長の光を放出する。クエンチャーは、蛍光物質から光エネルギーを受取り、それを光あるいは熱エネルギーとして放出する分子である。エネルギーを光で放出するクエンチャーとしては TAMRA が、熱で放出するクエンチャー（ダーククエンチャー）としては Eclipse や DABCYL がよく用いられている。

参考

FRET とは？　・・・・

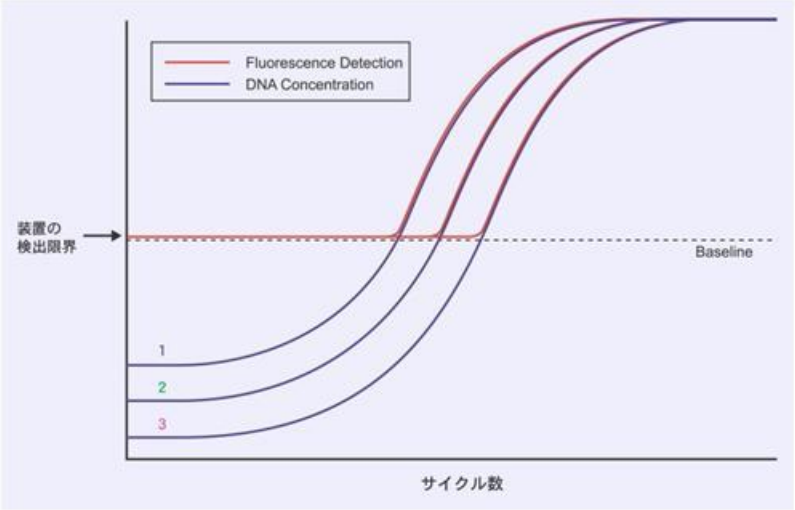
ドナー（蛍光物質）とアクセプター（クエンチャー）の間で生じるエネルギーのトランスファー現象。ドナーとアクセプターが近接していると、両者の間で FRET が起こる。このとき、ドナーのエネルギーはアクセプターに移動し、ドナーは基底状態に戻る。アクセプターは励起状態となり、アクセプターが発する蛍光シグナルが検出される。ドナーとアクセプターの距離が離れると FRET は起こらず、アクセプターからの蛍光シグナルは検出されない。

２） リアルタイム PCR 装置による検出の原理

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングするため、指数関数的増幅域での正確な検出を行うことができます。これは、エンドポイントで解析する従来の RT-PCR 法などとは大きく異なる点です。

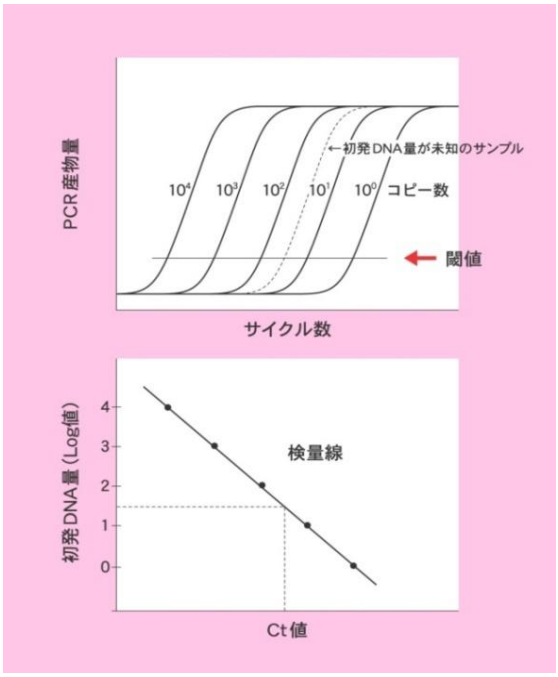
PCR では、1 サイクルごとに DNA が 2 倍、4 倍、8 倍、・・・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この増幅の様子を、蛍光のシグナル強度の上昇という形で、リアルタイム PCR 装置の画面でモニタリングします。得られた蛍光強度の増加量を単位時間ごとにプロットした曲線を増幅曲線と呼びます。

下記は、典型的な増幅曲線の模式図です。DNA 濃度（実際の増幅産物量）を青線で示し、それを蛍光により検出したシグナル強度を赤線で示しています。PCR 増幅産物量が装置の蛍光検出できる量に達すると、増幅曲線が立ち上がり始め、指数関数的にシグナルが上昇した後、プラトーに達します。Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズの結果解析画面上には、赤線部分のみが表示されます。



初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量は早く検出可能な量に達するので、増幅曲線が早いサイクルで立ち上がってきます。よって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイム PCR を行うと、初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。増幅直線上の適当なところに閾値（Threshold）を設定し、閾値と増幅曲線が交わる点を Ct 値（Threshold Cycle）として算出します。

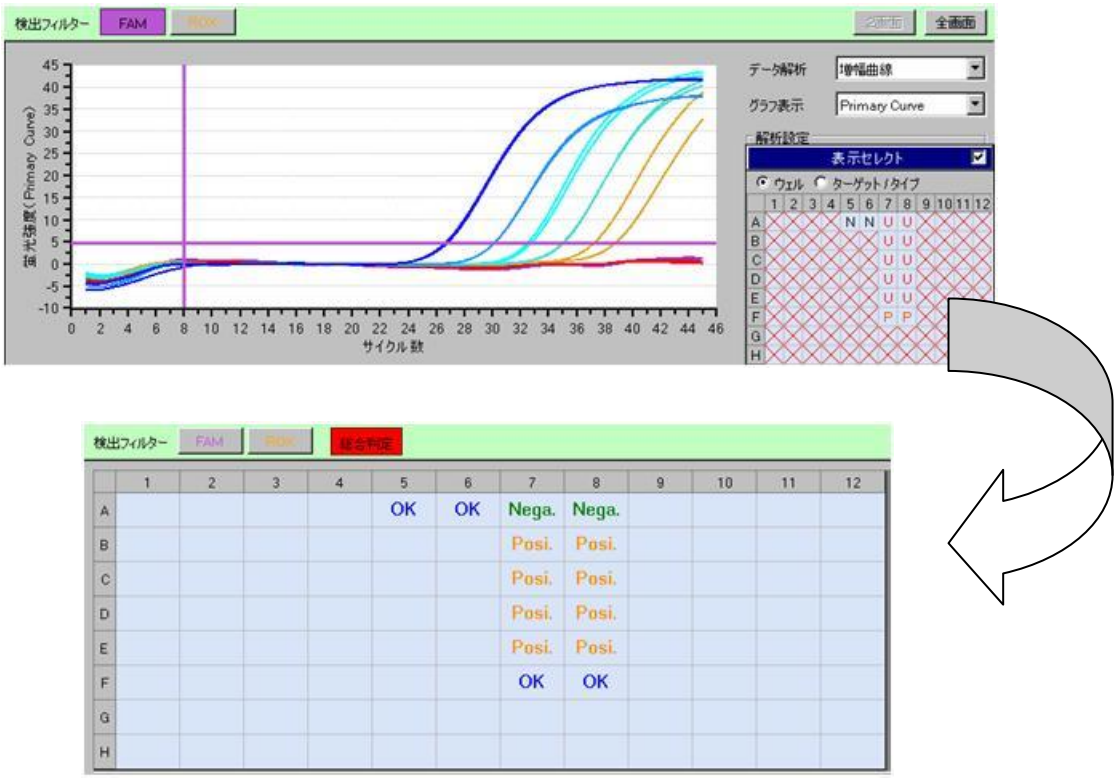
リアルタイム PCR 用キットでは、こうして得られた Ct 値を利用し、結果判定を行っています。また、Ct 値と初期鋳型量の間には直線関係があり、下図のような検量線を作成することもできます。未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることが可能です。



◎ スタンダードサンプルを用いてＣｔ値を元に検量線を作成し､未知サンプルを定量する場合のモデルケース（Ct 値とは、PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数である。）

次項以降、各種キットを利用した例では、主に Plus/Minus Assay による定性解析法で結果を求めています。

ある一定サイクル数の間に目的の遺伝子が増幅し、Ct 値が算出できたものをプラス（Posi.）、目的遺伝子が増幅せず Ct 値が算出できなかったものをマイナス（Nega.） として判定し、装置画面には下の図のように表示されます。



Thermal Cycler Dice® Real Time System *III* の表示画面

こんな時は、どうすればいいの？

〈サンプルの希釈方法〉

【絶対定量解析のための検量線作成用標準サンプルについて】

検量線を作成するには、絶対量（コピー数）が既知でターゲット DNA と同じ塩基配列をもった標準サンプルが必要です。検量線作成用の標準サンプルとしては、できるだけ測定対象である実ターゲット DNA や RNA の形状に近いものが望まれます。しかし、入手が困難な場合、人工的に作成した目的遺伝子の配列を有している DNA や RNA（プラスミド DNA や *in vitro* 転写産物など）で代用することがあります。人工合成遺伝子を鋳型にした場合と実ターゲット DNA や RNA を鋳型にした場合の PCR 増幅効率が一致していることを確認しておくことをお薦めします。

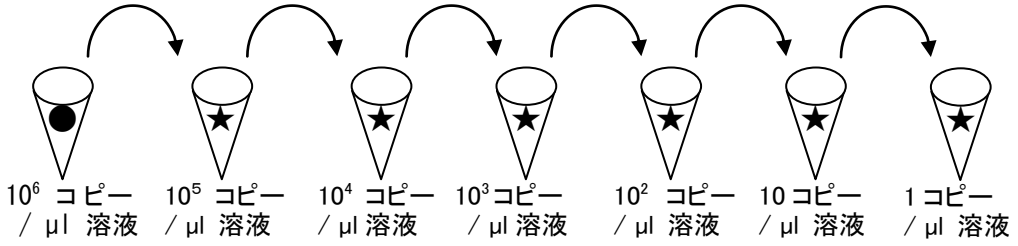
検量線作成用標準サンプルの希釈方法

希釈率は実験内容に応じて調節してください（1/5 や 1/10 など）。ここでは、1/10 での段階希釈例をご紹介します。希釈は、TE buffer 等を用いて行いますが、EASY Dilution（for Real Time PCR）（製品コード 9160）を使用することで、低濃度までの正確な希釈が可能です。

1）サンプル原液（10^6 コピー/ µl）を 1/10 の希釈率で 7 段階に希釈する例

サンプル原液（10^6 コピー/ µl）を 1/10 の希釈率で 7 段階に希釈する例を示します。

- □ サンプルを、EASY Dilution（for Real Time PCR）で段階希釈する。
- □ 1.5 ml マイクロチューブを 6 本準備し、サンプル濃度を記載する。
- □ 準備した 6 本のチューブに EASY Dilution を 45 µl ずつ分注する。
- □ 分注した EASY Dilution 45 µl にサンプル溶液 5 µl を加える。
  （ピペットを 5〜6 回ポンピングしてチップに残ったサンプル溶液を洗い出す）
- □ ボルテックスを使用して、希釈したサンプル溶液を均一に混合する。
  その後、卓上遠心機（チビタン）でスピンダウンをする。
- □ 上記の操作を繰り返し、各濃度のサンプル溶液を希釈調製する。



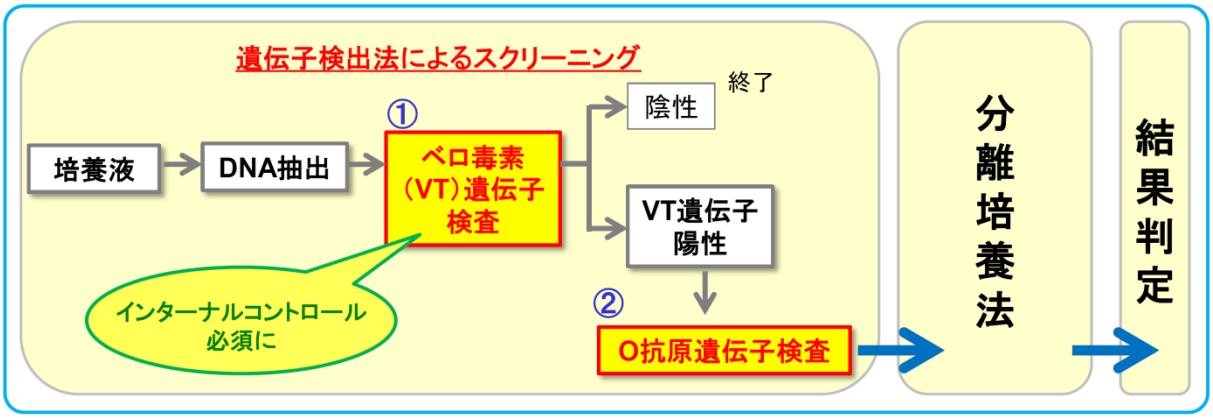
No.	サンプル内容	濃度	希釈方法
1	Standard 1	10^6 コピー/ µl	サンプル原液
2	Standard 2	10^5 コピー/ µl	(EASY Dilution 45 µl) + (10^6 コピー/ µl 溶液 5 µl)
3	Standard 3	10^4 コピー/ µl	(EASY Dilution 45 µl) + (10^5 コピー/ µl 溶液 5 µl)
4	Standard 4	10^3 コピー/ µl	(EASY Dilution 45 µl) + (10^4 コピー/ µl 溶液 5 µl)
5	Standard 5	10^2 コピー/ µl	(EASY Dilution 45 µl) + (10^3 コピー/ µl 溶液 5 µl)
6	Standard 6	10 コピー/ µl	(EASY Dilution 45 µl) + (10^2 コピー/ µl 溶液 5 µl)
7	Standard 7	1 コピー/ µl	(EASY Dilution 45 µl) + (10 コピー/ µl 溶液 5 µl)
8	N. C.	No Template	EASY Dilution

III. 厚生労働省通知法に関連したキットのご紹介

1　通知法に収載されたキット

1-1）腸管出血性大腸菌

腸管出血性大腸菌の検出においては、まずベロ毒素遺伝子の保有状況によるスクリーニングを行い、ベロ毒素遺伝子陽性であれば、0 抗原型の遺伝子タイピングをした上で、分離培養を行う方法が効率的であるとされています。



［ ベロ毒素（VT）遺伝子検査 ］

Cycleave®PCR O157（VT gene）Screening Kit Ver. 2.0（製品コード CY217A/B）

本キットは、O157：H7 をはじめとする腸管出血性大腸菌による食中毒の原因遺伝子であるベロ毒素遺伝子(VT1, VT2 遺伝子)を、リアルタイム PCR により検出することができます。

- **厚生労働省からの通知に収載**
  厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通（平成 26 年 11 月 20 日）
  「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」
  （食安監発 1120 第 1 号）
- 1チューブでインターナルコントロールによる偽陰性チェックが可能！

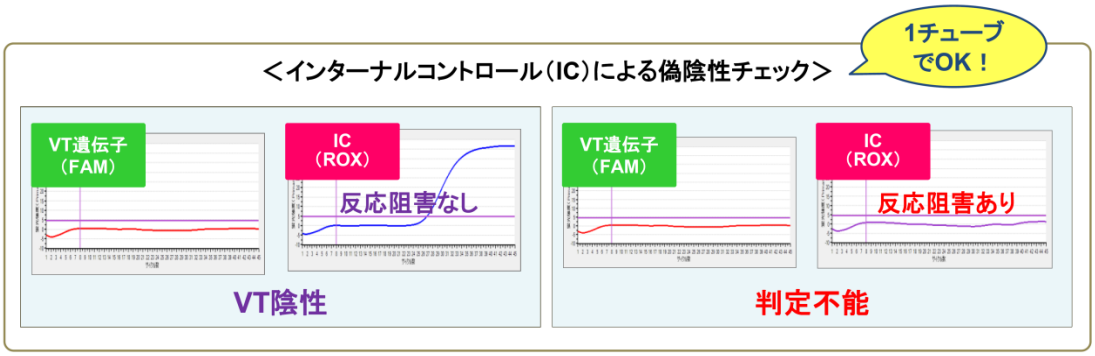
- 抽出試薬も含んだオールインワンキット
- プレミックス試薬なので、初心者でもかんたん
- FAMとROXを検出できる幅広いqPCR装置で使用可能

＜キットの内容＞

リアルタイム PCR 試薬
1. 2×Cycleave Reaction Mixture
2. VT Primer/Probe Mix (FAM, ROX)
3. dH_2O

アルカリ熱抽出
4. NaOH Solution (50 mM)
5. Tris-HCl Buffer pH7.0 (1 M)
6. dH_2O(for dilution)

陽性コントロール
7. VT1 Positive Control
8. VT2 Positive Control



［ O 抗原遺伝子タイピング ］

Cycleave®PCR EHEC (O157/O26) Typing Kit (製品コード CY237)

Cycleave®PCR EHEC (O111/O121) Typing Kit (製品コード CY238)

Cycleave®PCR EHEC (O103/O145) Typing Kit (製品コード CY239)

腸管出血性大腸菌 O 抗原型の主要な血清型 6 種類、O157／O26、O111／O121、O103／O145 の遺伝子を、リアルタイム PCR によりタイピングすることができます。

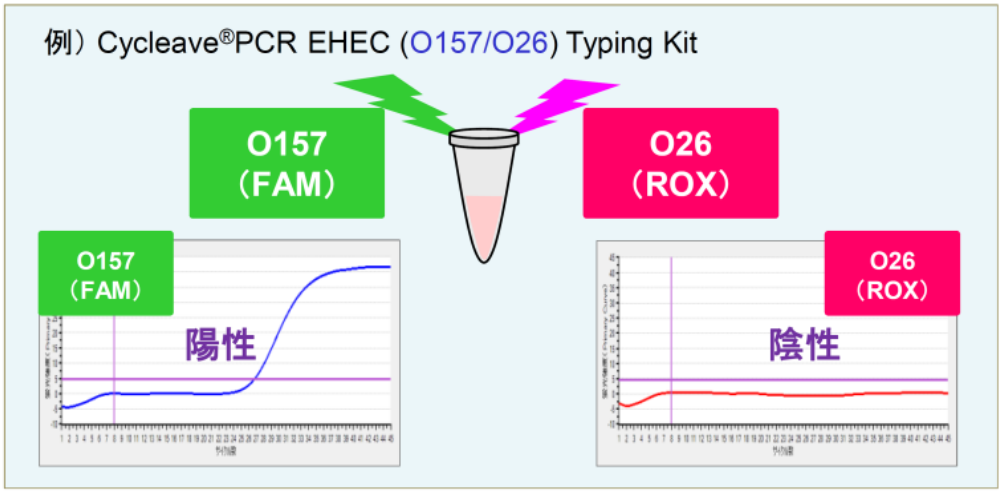
- **厚生労働省からの通知に収載**
  厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通（平成 26 年 11 月 20 日）「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」（食安監発 1120 第 1 号）
- **主要な 6 血清型をタイピングできる試薬キットをラインナップ**
- **プレミックス試薬なので初心者でも簡単**
- **FAM と ROX を検出できる幅広い qPCR 装置で使用可能**

＜キットの内容＞ CY237 の場合

リアルタイム PCR 試薬
1. 2 × Cycleave Reaction Mixture
2. O157/O26 Primer/Probe Mix
3. dH_2O

陽性コントロール
4. O157 Positive Control
5. O26 Positive Control
6. EASY Dilution (for Real Time PCR)

製品	ターゲット遺伝子	蛍光検出波長
CycleavePCR EHEC (O157/O26) Typing Kit	O157	FAM
	O26	ROX
CycleavePCR EHEC (O111/O121) Typing Kit	O111	FAM
	O121	ROX
CycleavePCR EHEC (O103/O145) Typing Kit	O103	FAM
	O145	ROX



Cycleave®PCR EHEC(O157/O26) Typing Kit
(製品コード CY237)

1-2）クリプトスポリジウム属・ジアルジア

Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit (製品コード CY230)

Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit (製品コード CY231)

クリプトスポリジウム属あるいはジアルジアの 18S rRNA 遺伝子をターゲットとして、ゲノム DNA 上の遺伝子に加え、cDNA も検出するキットです。ゲノム DNA に比べて RNA はコピー数が多いことが知られており、RNA を対象としたリアルタイム PCR 法により高感度な検出ができます。

●厚生労働省からの通知に収載
厚生労働省健康局水道課長通知「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」(健水発0302第2～4号)(平成24年3月2日発付) において、「遺伝子検出法」のひとつとして「リアルタイムPCR法」が収載されました。試料水中の1個のオーシスト等を検出する感度が求められることから、基本的に逆転写PCR(RT-PCR)法が推奨されています。

●定量解析が可能
キット添付のポジティブコントロールDNAを段階希釈して検量線を作成することにより、定量解析が可能です。厚生労働省からの通知法の付録には、「遺伝子検査法におけるオーシスト等の定量」が収載されています。

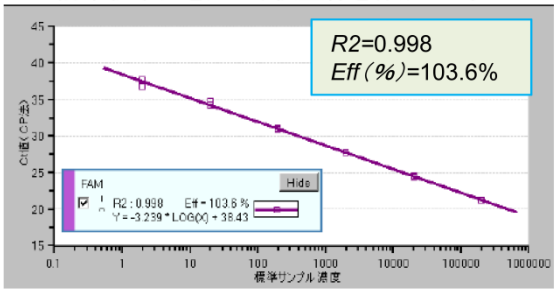
●偽陰性チェックが可能
一本のチューブでインターナルコントロールを同時検出するので、常に偽陰性のモニターが可能です。

●オールインワンキット
核酸抽出試薬、逆転写試薬、リアルタイムPCR試薬が含まれるので、磁気ビーズ法で精製したオーシスト／シストがあれば、すぐにリアルタイムPCRができます。

●増幅産物のシーケンス解析で遺伝子型を解析
反応チューブをそのままお送りいただくだけで、熟練の技術で高品質に解析し、最新データベースとの相同性検索結果を納品します。

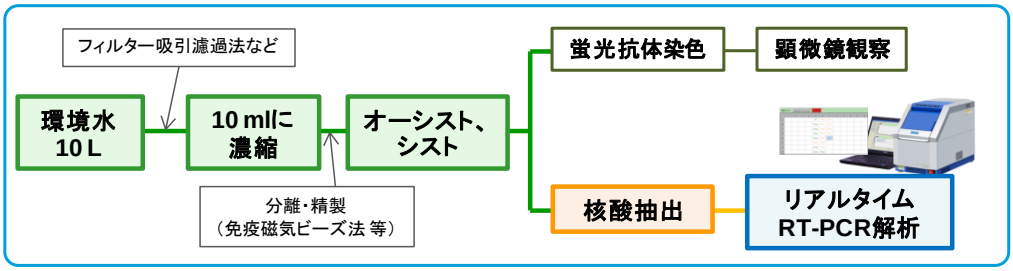
■実験例：キット(CY230)に添付されたポジティブコントロールDNAを用いた検量線

キットに含まれるPositive Control 2(1×10^{5}copies/μl)の10倍希釈系列を用い、検量線を作成した。



＜キットの内容＞

逆転写試薬
1. 5×PrimeScript RT Master Mix
リアルタイム PCR 試薬
2. 2×Cycleave Reaction Mixture
3. *Crypto.* Primer/Probe Mix (FAM、ROX)
4. RNase Free dH_2O
核酸抽出試薬
5. Lysis Buffer
6. Proteinase K
7. dH_2O (for Dilution)
定量用 Positive Control
8. *Crypto.* Positive Control (1×10^5 copies/ μl)
9. EASY Dilution (for Real Time PCR)



２　通知法収載の配列を採用したキット

２－１）ノロウイルス

TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit （製品コード RR250A/B ）

厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課より通知された「ノロウイルスの検出法について」（食安監発第 1105001 号）（最終改正 平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号）に収載された塩基配列の GI 検出用および GII 検出用プライマーならびに TaqMan プローブを使用したリアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス検出キットです。

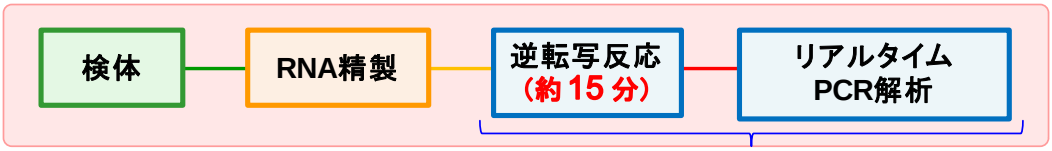
●厚生労働省より通知の方法(注)（以下「公定法」）と相関性の高い定量解析が可能
公定法で用いられるコントロールプラスミドDNAと同等の定量結果が得られることを確認しています。

●コンポーネントは使いやすいプレミックス
面倒な試薬調製は一切不要、初心者でも簡単に使用できます。

●逆転写反応はわずか15分で完了！
独自開発の逆転写酵素の採用により、反応時間の短縮が実現しました。

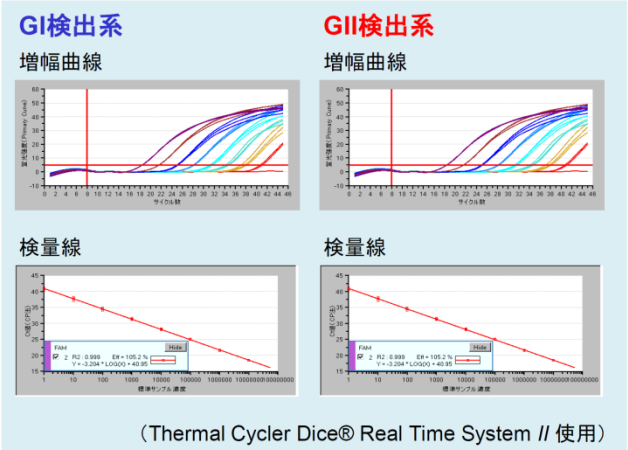
※本製品は、群馬県衛生環境研究所との共同研究の成果に基づき製品化しました。

（注）厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課より通知された「ノロウイルスの検出法について」
（食安監発第1105001号）（最終改定平成19年5月14日食安監発第0514004号）



■実験例：Positive Control DNAを用いた検量線の作成

【方法】TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kitでは、キットに含まれるGI/GII Positive Control DNAの段階希釈液を用いて検量線を作成し、検体サンプル中のGI/GII コピー数を算出することができます。



（Thermal Cycler Dice® Real Time System II 使用）

【結果】
GI/GII遺伝子とも、10 copies ～1×10^7 copies の範囲で、精度よく検量線が作成できることを確認しています（25 µl 反応系、n=3）。
公定法で求められる定量試験と同等の精度での解析にご利用いただけます。

＜キットの内容＞

逆転写試薬
1. 5×PrimeScript Buffer (NV)
2. PrimeScript RT Enzyme Mix (NV)
3. Random 6 mers

リアルタイム PCR 試薬
4. *Premix Ex Taq* (NV) (2×)
5. GI Primer Mix
6. GII Primer Mix
7. GI Probe Mix
8. GII Probe Mix
9. ROX Reference Dye (50×)
10. ROX Reference Dye II (50×)
11. RNase Free dH_2O

定量用 Positive Control DNA
12. GI Positive Control DNA (4×10^6 copies/ µl)
13. GII Positive Control DNA (4×10^6 copies/ µl)
14. EASY Dilution (for Real Time PCR)

2-2）クドア・セプテンプンクタータ

Kudoa septempunctata (18S rRNA) qPCR Detection Kit（製品コード RR260A）

厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課より通知された「Kudoa septempunctata の検査法について（暫定版）」（食安監発 0711 第 1 号）に収載された塩基配列のプライマーならびに TaqMan プローブを使用したリアルタイム PCR 法によるクドア・セプテンプンクタータ検出キットです。

●通知法※に収載された塩基配列のプライマー、プローブで定量解析

●コンポーネントは使いやすいプレミックス

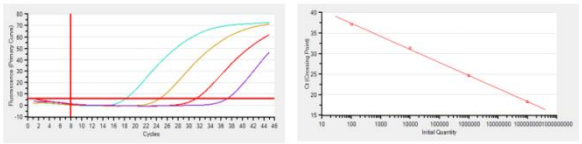
●幅広いリアルタイムPCR装置で使用可能

※ 厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課長通知（平成23年7月11日）
「Kudoa septempunctata の検査法 について（暫定版）」（食安監発0711第1号）

■実験例：Positive Control を用いた検量線作成例

【方法】
Kudoa septempunctata (18S rRNA) qPCR Detection Kitでは、キットに含まれるKudoa Positive Controlの段階希釈液を用いて検量線を作成し、検体サンプル中の18S rRNAコピー数を算出することができます。
・2.5×10^7、2.5×10^5、2.5×10^3、2.5×10^1 copies/μl の溶液にて検量線を作成した。（各反応系での最終コピー数はそれぞれ1×10^8、1×10^6、1×10^4、1×10^2 になる。）

増幅曲線　　検量線

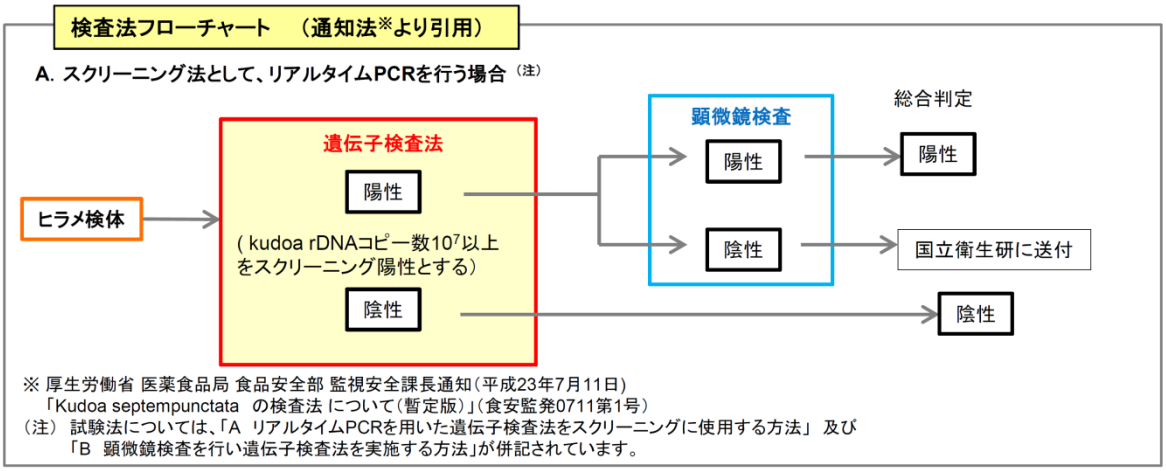


★Thermal Cycler Dice® Real Time System *III* (製品コードTP900)、Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コードTP700)のほか、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Life Technologies社）などで使用可能です。

＜キットの内容＞

リアルタイム PCR 試薬
1. *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus)
2. Kudoa Primer/Probe Mix
3. dH_2O
4. ROX Reference Dye
5. ROX Reference Dye II

定量用 Positive Control DNA
6. Kudoa Positive Control
   (2.5×10^7 copies/ μl)
7. EASY Dilution (for Real Time PCR)



※ 厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課長通知（平成23年7月11日）
「Kudoa septempunctata の検査法 について（暫定版）」（食安監発0711第1号）
（注） 試験法については、「A リアルタイムPCRを用いた遺伝子検査法をスクリーニングに使用する方法」 及び「B 顕微鏡検査を行い遺伝子検査法を実施する方法」が併記されています。

IV. キットを利用した応用例のご紹介

１）ネギトロ用まぐろからのリステリア菌の検出と菌数の算出

・Cycleave®PCR *Listeria monocytogenes*（*inlA* gene） Detection Kit （製品コード CY223）

検出ターゲット	
FAM	ROX
Internalin A（*inlA*）遺伝子： *Listeria monocytogenes*が細胞内に侵入するときに関与する分子 Internalin A をコードする遺伝子	インターナルコントロール： ターゲットとは無関係な配列を有する DNA（偽陰性の判定が目的）

リステリア菌はグラム陽性、鞭毛を持つ無芽胞の短桿菌であり、これらの中でヒトリステリア症の病原菌はリステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）1 菌種と報告されており、発熱、頭痛をともなった髄膜炎や敗血症、心内膜炎、肺炎などの多発性膿瘍を引き起こします。ここでは、ネギトロ用まぐろからのリステリア菌の検出と菌数の算出を行ったデータをご紹介します。

【方法】

ネギトロ用まぐろを 10 g ずつストマッカー袋に取り、前培養した *Listeria monocytogenes* 菌液を 10^2 CFU/g となるように段階希釈後菌液を接種し、20℃で 36 時間培養した。6 時間毎にストマッカー袋を回収し、90 ml の滅菌生理食塩水を加え、ストマック処理を行い、食品乳剤とした。これを 1 ml ずつエッペンドルフチューブに取って集菌後、DNA 抽出 Kit* により DNA サンプルを抽出し、最終溶出液量 50 µl のうち 2.5 µl をリアルタイム PCR に供した。同時に、食品乳剤を適宜希釈した 100 µl を PALCAM 寒天培地に塗沫し、培養後、菌数を測定し生菌数を調べた。

また、検量線作成用の DNA サンプルも下記の方法で調製した。まず、ネギトロ用まぐろ 10 g を滅菌生理食塩水 90 ml で乳剤とし、1 ml ずつエッペンドルフチューブに分注した。そこに本菌培養液を 10^9 から 10^3 CFU/ml まで段階希釈した菌液をそれぞれ 100 µl ずつ接種し、混合した。それぞれ集菌後、DNA 抽出 Kit* により DNA を調製し、DNA サンプル最終溶出液量 50 µl のうち 2.5 µl をリアルタイム PCR に用いた。

*DNA 抽出キットには NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10）等がご使用いただけます。

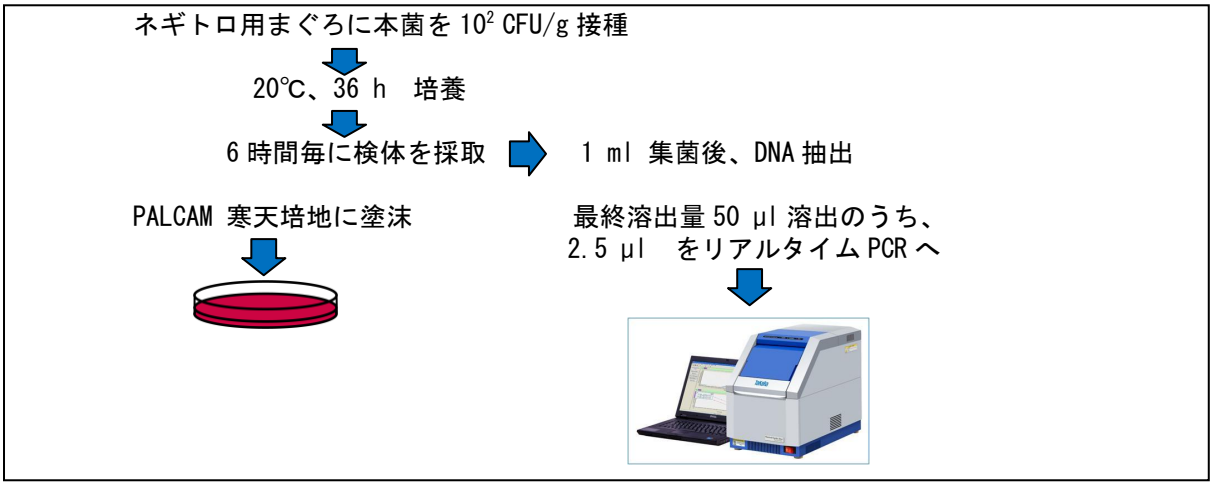


図 1：実験の流れ

【結果】

それぞれの時間毎にサンプリングした試料において、Cycleave®PCR *Listeria monocytogenes* (*inlA* gene) Detection Kit によるリアルタイム PCR の結果から算出した菌量と、培養法で得られた結果は、ほぼ一致していました。

Cycleave®PCR *Listeria monocytogenes* (*inlA* gene) Detection Kit は、*Listeria monocytogenes* の検出および定量に有用であることが示唆されました。

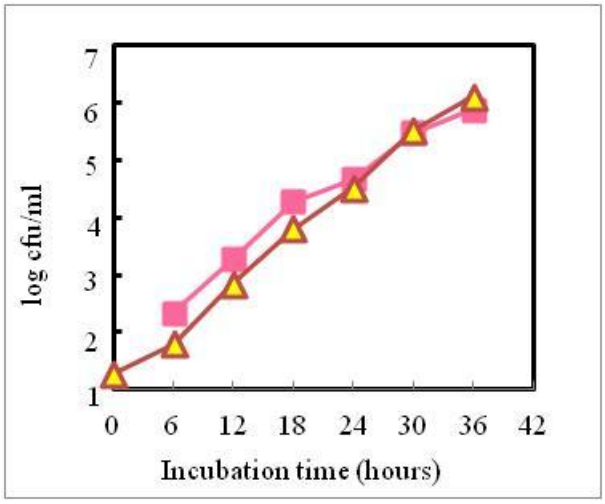


図 2：培養法及び CycleavePCR 法によるネギトロ用まぐろに接種した *L. monocytogenes* の各時間での菌数の比較

※本データは、東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科研究院　木村凡先生、高橋肇先生にご提供いただきました。

２）　アサリ剥き身またはアジからの *tdh* 遺伝子保有腸炎ビブリオの検出

・CycleavePCR® *Vibrio*（*tdh* gene） Detection Kit　（製品コード CY220）

検出ターゲット	
FAM	ROX
tdh 遺伝子： 腸炎ビブリオ菌の食中毒病原遺伝子である耐熱性溶血毒遺伝子	インターナルコントロール： ターゲットとは無関係な配列を有する DNA（偽陰性の判定が目的）

腸炎ビブリオ（*Vibrio parahaemolyticus*）はわが国で発見された重要な食中毒病原菌であり、その食中毒病原因子のひとつとして耐熱性溶血毒（TDH）があります。
ここでは、アサリ剥き身またはアジ（エラ、内臓、尾）から腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒遺伝子（*tdh* 遺伝子）を検出した例をご紹介します。

【方法】

腸炎ビブリオが感染している可能性のあるアサリ剥き身またはアジ（エラ、内臓、尾）それぞれ 25 g を滅菌ハサミで細切した後、ストマッカー袋に入れ、アルカリペプトン水とよく混和して乳剤化後、37℃で 18 時間培養した。増菌培養液 1 ml を 2 本用意し、遠心（13,000 rpm、5 min）後、上清を除き、沈渣を得た。1 本は、DNA 抽出 Kit* を用いて DNA 抽出を行い、最終溶出量 200 µl のうち 5 µl をリアルタイム PCR に供した。もう 1 本は、沈渣を滅菌水 100 µl で再浮遊し、加熱（100℃、5 分）後、遠心（13,000 rpm、5 min）し、上清 5 µl をリアルタイム PCR に供した。
*DNA 抽出キットには NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10）等がご使用いただけます。

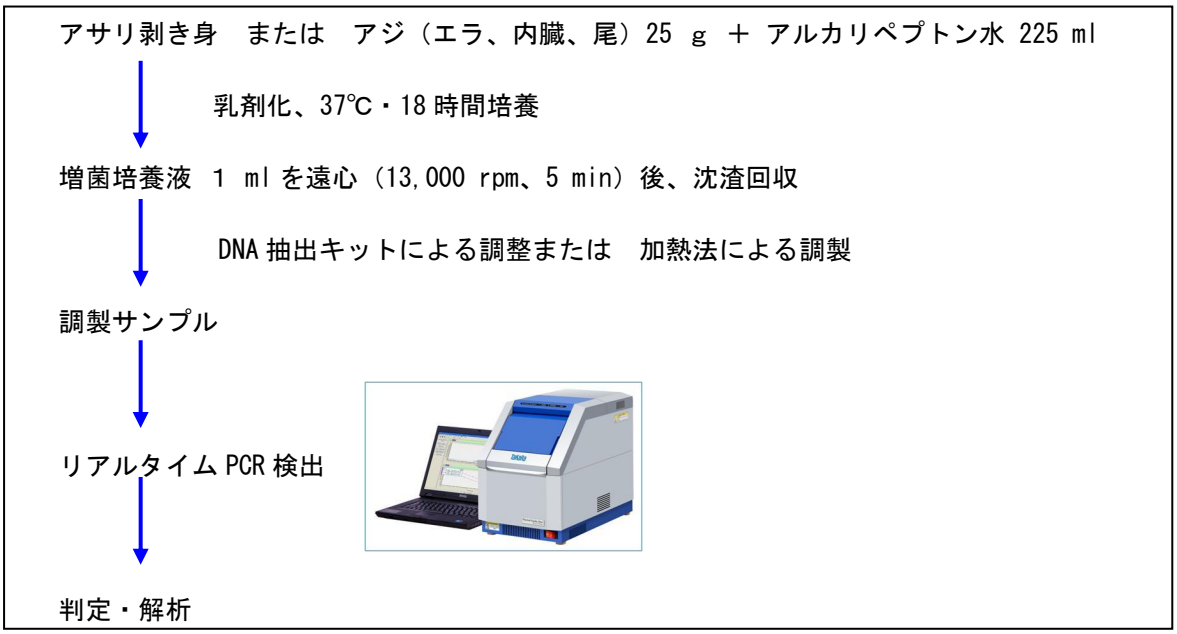


図 1：アサリ・アジをサンプルとした増菌培養液からの *tdh* 遺伝子のリアルタイム PCR 検出

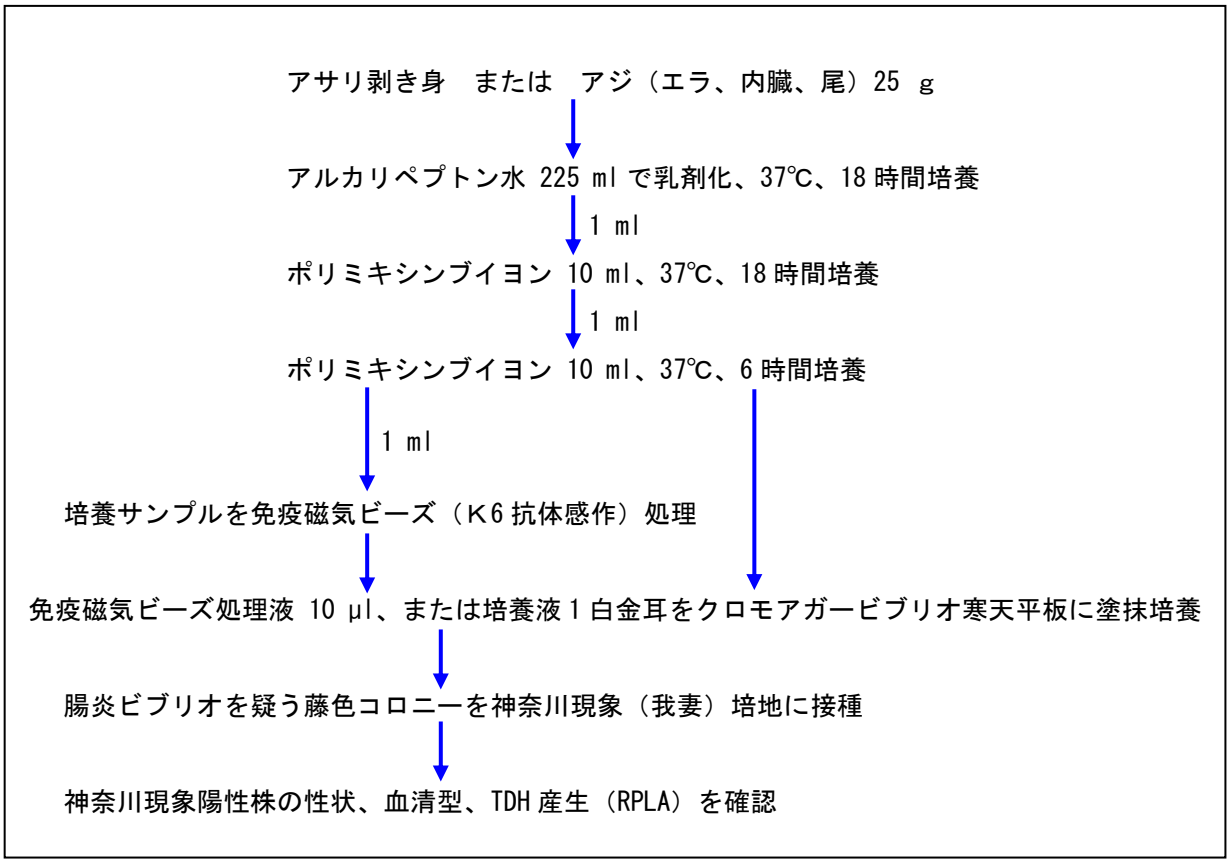


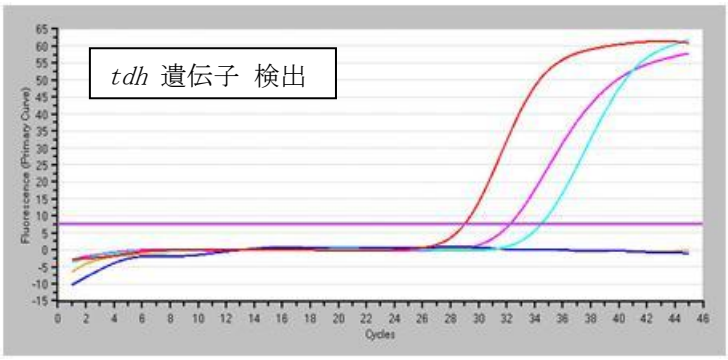
図 2：培養法による魚貝類からの TDH 産生腸炎ビブリオの検出の流れ

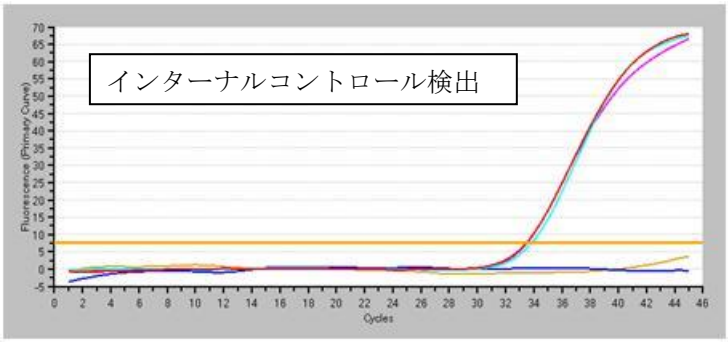
【結果】

アサリ剥き身・アジ由来の各増菌培養液ともに、DNA 抽出 Kit を用いて精製したサンプルを用いた場合、Cycleave®PCR *Vibrio*（*tdh* gene）Detection Kit による *tdh* 遺伝子の検出が可能でした。アサリ由来の培養液は、熱処理サンプルの場合でも *tdh* 遺伝子が検出されましたが、アジ由来の培養液の場合は、熱処理サンプルでは検出できませんでした。この場合、インターナルコントロールも不検出であったため、PCR 反応阻害物質の影響であったことが考えられます。このように、食品サンプルに PCR 反応の阻害物質が含まれている場合は、DNA 抽出 Kit などによるサンプル精製が有効であることが分かります。

なお、培養法では、免疫ビーズ処理と無処理の両法を実施しましたが、アジ由来のサンプルは、免疫ビーズ無処理法により、TDH 産生腸炎ビブリオ（O10：K52）が検出されました。アサリ由来のサンプルについては、両法とも TDH 産生腸炎ビブリオを検出できませんでした。

このことは、DNA 抽出 Kit で抽出したサンプルを Cycleave®PCR *Vibrio*（*tdh* gene）Detection Kit に用いれば、培養法で検出しにくいサンプル（TDH 非生産株が多く共存しているなど）の場合も反応阻害を受けることなく、特異的に検出できることを示しており、環境や食品の腸炎ビブリオの TDH 産生菌の検査に有効であることが示唆されました。





【検出可能】

- **アジ由来サンプル（DNA 抽出 Kit）**
- **アサリ由来サンプル（熱処理）**
- **アサリ由来サンプル（DNA 抽出 Kit）**

【検出不能】

- アジ由来サンプル（熱処理）
- アジ由来サンプル（熱処理）

※本データは、静岡県環境衛生科学研究所 微生物部（現：株式会社 マルマ 研究開発部）杉山寛治先生よりご提供いただきました。

３）　ドライソーセージの原材料肉を判別

・Cycleave®PCR 肉種判別キット(6 種)　（製品コード CY218）

検出ターゲット	
FAM	ROX
cytochrome c oxidase subunit Ⅰ （cox Ⅰ）遺伝子：ウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ウサギのミトコンドリア DNA 上にある coxⅠ遺伝子	インターナルコントロール：ターゲットとは無関係な配列を有する DNA（偽陰性の判定が目的）

Cycleave®PCR 肉種判別キット(6 種)を使用すれば、原料肉のウシ、ブタ、ニワトリ、ウマ、ヒツジ、ウサギの 6 種の種判別が可能です。ここでは、DNA 抽出 Kit を使用して加工食肉製品のドライソーセージから DNA 調製を行った後、リアルタイム PCR により含有肉種の判別を行った例をご紹介します。

【方法】

ドライソーセージ 10 mg から、NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10）等の DNA 抽出 Kit を用いて DNA 調製を行い、24.4 ng/ µl の濃度で DNA サンプルを得た。これを 2 ng/ µl 濃度に調製し、Cycleave®PCR 肉種判別キット(6 種)の反応に 5 µl を使用して（10 ng/反応）、肉種判別を行った（図１）。

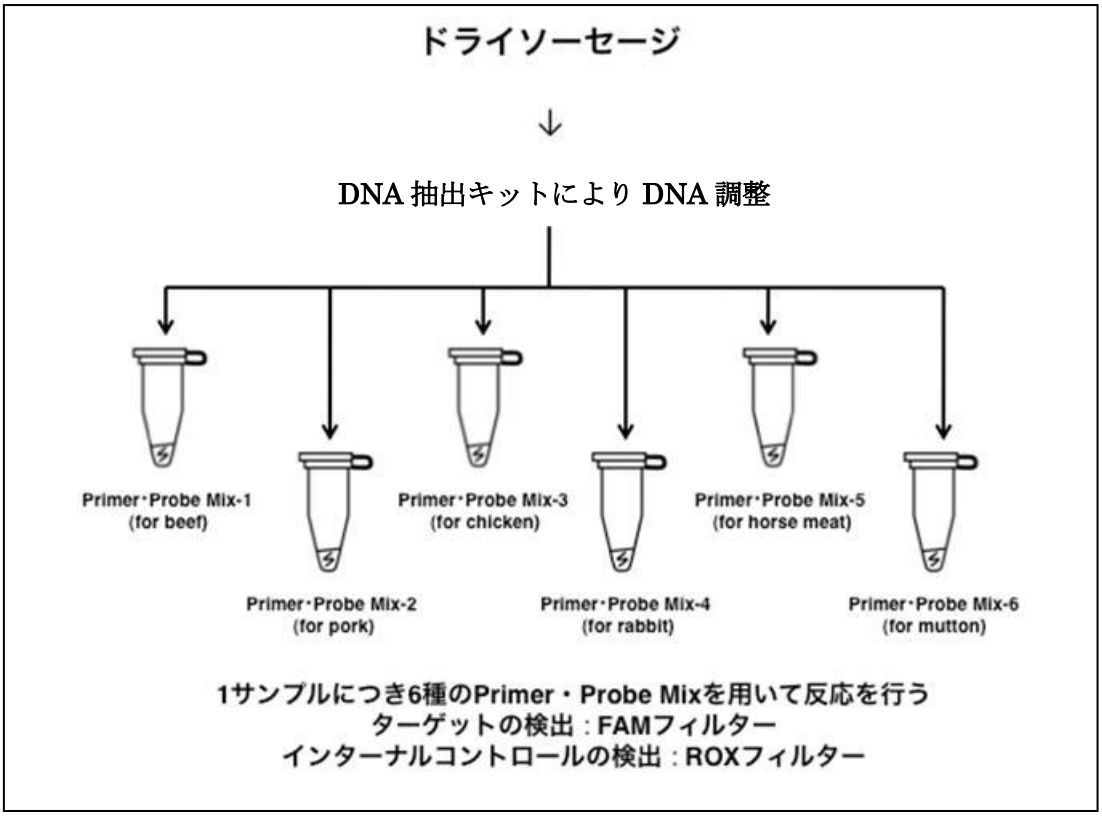
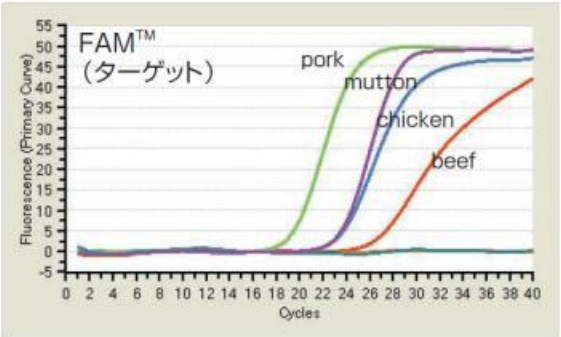


図１：ドライソーセージからの肉種判別実験フローチャート

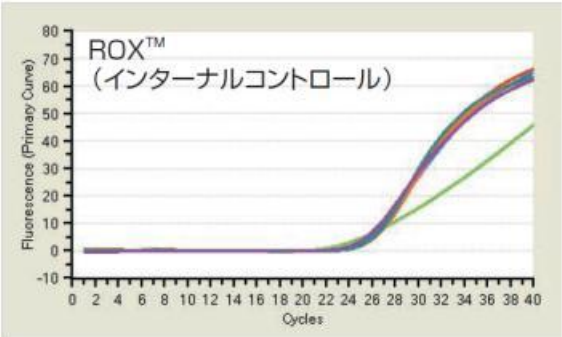
【結果】

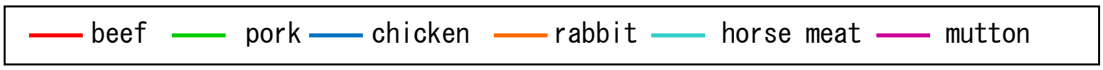
ドライソーセージの製品に記載されている原材料のうち、食肉原材料は畜肉（豚肉，マトン、牛肉)、鶏肉となっており、今回の判定結果ではこれら 4 種類の肉種が検出されました（図 2)。このように、DNA 抽出 Kit を使用して加工食肉製品から簡単に DNA を調製することができ、Cycleave®PCR 肉種判別キット(6 種）によって、迅速に原材料肉の肉種を判定できることが分かりました。

＜ A ＞

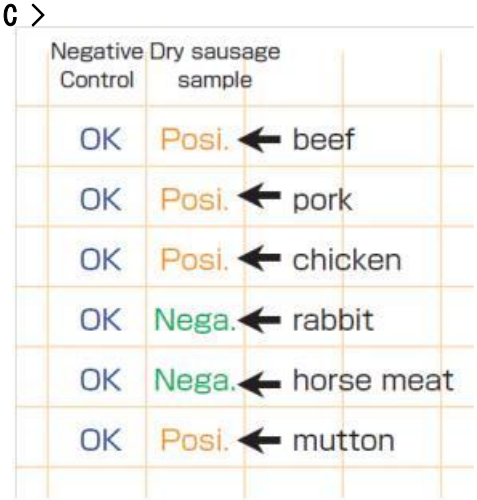


＜ B ＞





＜ C ＞



＜ D ＞

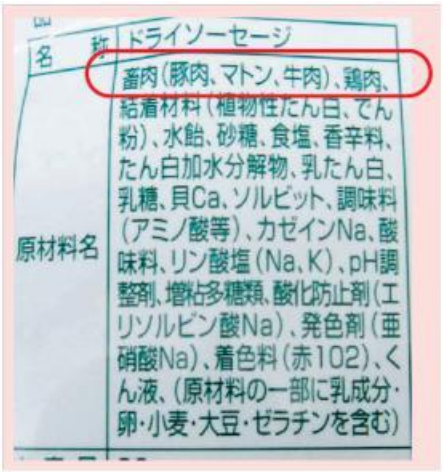


図 2. : Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* と CycleavePCR®肉種判別キット(6 種)を用いたドライソーセージサンプルの肉種判別結果

＜ A ＞増幅曲線（FAM)： 標記 4 種類の肉種において検出された。
＜ B ＞増幅曲線（ROX)： すべてのサンプルについて、検出された。(PCR 反応阻害は無し)
＜ C ＞判定結果（Thermal Cycler Dice® Real Rime System において Plus/Minus Assay の場合)：ネガティブコントロール、ポジティブコントロールは、問題なく機能しており「OK」。
検体については、そのつど「Posi.」「Nega.」との判定結果を表示。
＜ D ＞ ドライソーセージのパッケージに表示された原材料名:今回の反応で得られた結果と一致している。

４） 豚挽肉からの食中毒関連遺伝子の検出

・QuickPrimer *Escherichia／Shigella* group（製品コード MR201）
・QuickPrimer Shiga I （製品コード MR104）
・QuickPrimer Shiga II（製品コード MR105）

検出ターゲット		対応陽性コントロール	
MR201	16S rDNA 遺伝子	MR405	QuickPrimer Control DNA5
MR104	志賀毒素(ベロ毒素)I 型 Shiga I 遺伝子	MR403	QuickPrimer Control DNA3
MR105	志賀毒素(ベロ毒素)I 型 Shiga II 遺伝子	MR404	QuickPrimer Control DNA4

QuickPrimer (Real Time) シリーズは、腸管出血性大腸菌やサルモネラ菌、カンピロバクター、セレウスなどの主要な食中毒菌の関連遺伝子を、SYBR® Green I を用いたリアルタイム PCR で検出するためのプライマーシリーズです。各プライマーは、特定の菌や病原因子の遺伝子の極めて特異的な配列部分に相補的に結合するよう設計されており、反応性の高いリアルタイム PCR 試薬として定評のある SYBR® *Premix Ex Taq* ™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420A/B*) と組み合わせて使用します。QuickPrimer とリアルタイム PCR 試薬はそれぞれプレミックスタイプであり、操作も簡便です。プローブ法に比べて安価な SYBR® Green I 検出によるリアルタイム PCR で、特異性の高い検出を実現します。Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* などのリアルタイム PCR 専用装置を用いて反応を行い、増幅曲線の Ct 値、および融解曲線のパターンと Tm 値をもとに結果を判定します。判定には、専用の陽性コントロール DNA (QuickPrimer Control DNA) を用いて取得した結果を基準値として使用します。ここでは、市販の生豚挽肉からの腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 の検出を行ったデータをご紹介します。

*この実験例では、SYBR® *Premix Ex Taq* ™ (Perfect Real Time) (製品コード RR041A/B) を使用しました。SYBR® *Premix Ex Taq* ™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420 A/B) は SYBR® *Premix Ex Taq* ™ (Perfect Real Time) (製品コード RR041A/B) の後継品で同様に使用できます。

【方法】

市販の生豚挽肉ならびに腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 株を接種した生豚挽肉を準備し、それぞれの増菌培養液を 0 および 4 時間後にサンプリングして DNA サンプルを調製した (図 1)。各 DNA サンプルを鋳型として、説明書に従って QuickPrimer と Thermal Cycler Dice® Real Time System *II* を用いたリアルタイム PCR 解析を行い、生豚挽肉における大腸菌／赤痢菌群の存在 (MR201 使用)、および志賀毒素 I 型遺伝子 (MR104 使用)、志賀毒素 II 型遺伝子 (MR105 使用) の有無を調べた。

試料（食材）；生豚挽肉 10 g
↓ ←緩衝ペプトン水 90 ml
—添加ストマッカー処理（260 rpm、1 分間）
10 倍希釈試料；40 ml 分取
↓ —遠心分離（7,000×g、15 分間、4 ℃）
沈渣
↓ ←大腸菌 0157 株の菌液（1×10^3 cfu/ml）2ml、（または生理食塩水）2 ml を添加し、
ボルテックスで懸濁
←緩衝ペプトン水 14 ml を添加
—増菌培養：37℃培養（0 時間、4 時間目にサンプリング）
増菌液 1.5 ml
↓
DNA 抽出*
↓
リアルタイム PCR による検出

図 1　実験フロー

＊ 増菌液をイージー・ビーズ（エーエムアール株式会社）で処理して菌を破砕し、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によりサンプル DNA を調製した。

【結果】

生豚挽肉（0157 株接種＋ /－）由来の増菌培養液から調製したサンプルを、リアルタイム PCR に供した際の増幅曲線および融解曲線を図 2 に示しました。培養 0 時間のサンプル（青ライン）では、0157 株接種の有無に関わらず、大腸菌／赤痢菌群 16S rDNA が検出され、志賀毒素 I 型および II 型遺伝子は検出されませんでした。一方、培養 4 時間のサンプル（赤ライン）では、0157 株接種サンプルで志賀毒素 I 型および II 型遺伝子が検出されましたが、接種なしの場合にはどちらも検出されませんでした。なお、接種の有無に関わらず、大腸菌／赤痢菌群 16S rDNA は 0 時間のサンプルより早い Ct 値で検出されました。同時に行った陽性コントロール DNA（対応する QuickPrimer Control DNA の 10 倍希釈液）を用いた反応で得た融解曲線パターンおよび Tm 値に基づき、各サンプルの判定を行った結果を以下にまとめました。

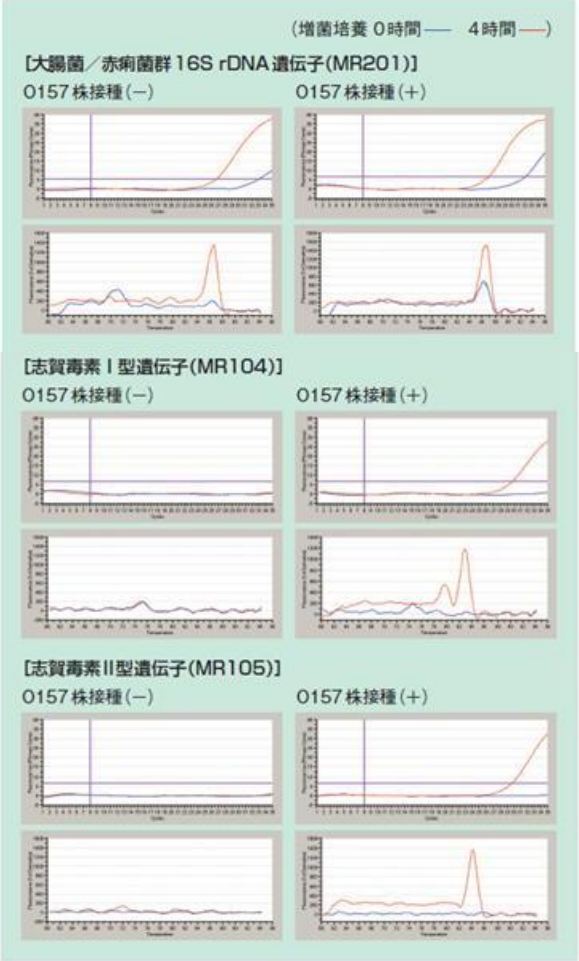


図 2　生豚挽肉由来サンプルを用いた
リアルタイム PCR 結果

上段：増幅曲線

下段：融解曲線

サンプル		検出対象遺伝子	Ct値	Tm値	判定
コントロール反応	陰性*1	16S rDNA	−	62.81	−
		Shiga I	−	74.94	−
		Shiga II	−	62.77	−
	陽性*2	16S rDNA	19.55	86.45	−
		Shiga I	22.16	82.67	−
		Shiga II	21.91	84.03	−
O157 株接種(−)	0時間	16S rDNA	32.07	86.26	陽性
		Shiga I	−	75.3	検出限界以下
		Shiga II	−	70.24	検出限界以下
	4時間	16S rDNA	26.66	86.52	陽性
		Shiga I	−	75.02	検出限界以下
		Shiga II	−	71.97	検出限界以下
O157 株接種(+)	0時間	16S rDNA	31.43	86.26	陽性
		Shiga I	−	74.64	検出限界以下
		Shiga II	−	62.79	検出限界以下
	4時間	16S rDNA	26.16	86.52	陽性
		Shiga I	29.22	82.94	陽性
		Shiga II	29.15	84.2	陽性

表 1　QuickPrimer での判定結果
(生豚挽肉由来サンプル)

*1：サンプルの代わりに滅菌蒸留水を添加

*2：陽性コントロール DNA での反応

以上の結果から、今回実験に使用した市販の生豚挽肉にはもともとわずかな量の大腸菌／赤痢菌群が存在したものの、食中毒の原因となる志賀毒素 I 型あるいは II 型遺伝子を有する腸管出血性大腸菌は検出されないことがわかりました。

V. 関連製品一覧

■リアルタイム PCR 装置

製品名	用途	製品コード	容量	価格
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*	96 ウェルプレート対応リアルタイム PCR 装置	TP900	一式	¥4,125,000
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*	48 ウェルプレート対応リアルタイム PCR 装置	TP700	一式	¥2,530,000

■リアルタイム PCR 装置関連製品（消耗品）

製品名	用途	製品コード	容量	価格
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps	独立型キャップ付き 8 連チューブ	NJ600	120 strips	¥19,800
0.2 ml Hi-8-Tube	8 連チューブ	NJ300	125 strips	¥16,500
0.2 ml Hi-8-Flat Cap	8 連チューブキャップ	NJ302	125 strips	¥4,400
96well Hi-Plate for Real Time	96 well プレート	NJ400	10 枚	¥6,050
Sealing Film for Real Time	96 well プレート用のシール	NJ500	100 枚	¥31,900
48 well snap plate	48wel プレート	NJ700	20plates	¥9,350
Flat cap for snap plate	48wel プレート用のフラットキャンプ	NJ720	120 strips	¥6,380

■リアルタイム PCR 検査キット

＜食品検査に＞

製品名	ターゲット	製品コード	容量	価格
Cycleave®PCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	ベロ毒素遺伝子(VT1, VT2 遺伝子)	CY217A CY217B	50 回 100 回	¥52,000 ¥96,000
Cycleave®PCR EHEC (0157/026) Typing Kit	O 抗原型の主要血清型（0157／026）	CY237	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR EHEC (0111/0121) Typing Kit	O 抗原型の主要血清型（0111／0121）	CY238	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR EHEC (0103/0145) Typing Kit	O 抗原型の主要血清型（0103／0145）	CY239	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR EHEC (0165) Typing Kit	O 抗原型の主要血清型（0165）	CY241	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR O-157 (VT1/VT2) Typing Kit	ベロ毒素遺伝子(VT1 遺伝子、VT2 遺伝子）を識別	CY222	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0	侵入性因子関連遺伝子 *invA*	CY205	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR *Vibrio*（*tdh* gene） Detection Kit	耐熱性溶血遺伝子 *tdh*	CY220	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR *Bacillus cereus*（CRS gene） Detection Kit	セレウリド合成酵素遺伝子	CY221	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR *Listeria monocytogenes*（*inlA* gene） Detection Kit	Internalin A（*inlA*）遺伝子	CY223	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR *Campylobacter*（*jejuni*／*coli*） Typing Kit	Cytolethal distending toxin 遺伝子の C サブユニット遺伝子(cdtC gene)	CY225	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR *Staphylococcus aureus* (DnaJ gene) Detection Kit	黄色ブドウ球菌の House Keeping 遺伝子のひとつである DnaJ 遺伝子	CY228	50 回	¥69,000
Cycleave®PCR 肉種判別キット(6 種)	肉種判別（ウシ、ブタ、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヒツジ）	CY218	20 サンプル	¥79,000
TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit	ノロウイルス Genogroup I (GI) と II (GII)	RR250A RR250B	50 回 250 回	¥90,000 ¥360,000
Kudoa septempunctata (18S rRNA) qPCR Detection Kit	18S rRNA 遺伝子	RR260A	50 回	¥66,000

＜水質検査に＞

製品名	ターゲット	製品コード	容量	価格
Cycleave®RT-PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit	16S rRNA 遺伝子	CY240S CY240	25 回 50 回	¥31,000 ¥57,000
Cycleave®RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit	18S rRNA 遺伝子	CY230	50 回	¥69,000
Cycleave®RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit	18S rRNA 遺伝子	CY231	50 回	¥69,000

＜スクリーニング検査に＞

製品名	用途	製品コード	容量	価格
SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)	長めのターゲットにも対応する SYBR® Green I 検出用試薬	RR420A RR420B	200 回 400 回	¥41,000 ¥79,000
QuickPrimer (Real Time)シリーズ	食中毒菌関連遺伝子検出用プライマー	MR101～ MR208	100 回	¥13,000

■核酸抽出関連製品

製品名	用途	製品コード	容量	価格
NucleoSpin® Tissue	バクテリアなどから高純度ゲノム DNA を迅速に精製	740952.10	10 回	¥6,900
		740952.50	50 回	¥23,000
		740952.250	250 回	¥103,000
NucleoSpin® Tissue XS	微量なサンプルからもゲノム DNA, 細菌 DNA, ウイルス DNA を効率よく精製	740901.10	10 回	¥7,900
		740901.50	50 回	¥29,400
		740901.250	250 回	¥132,000
NucleoSpin® Blood QuickPure	全血、血漿、血清、体液などから極めて迅速にゲノム DNA を精製	740569.10	10 回	¥6,000
		740569.50	50 回	¥19,500
		740569.250	250 回	¥93,000
NucleoSpin® Soil	土壌、汚泥、堆積物中のグラム陽性菌、古細菌、酵母、カビ類、藻類から DNA を効率よく抽出	740780.10	10 回	¥10,000
		740780.50	50 回	¥41,000
		740780.250	250 回	¥170,000

表示価格はすべて税別です。

【ライセンスについて】

[L4] Quencher ：This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.
[L34] ***B. cereus*** ：This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,264,959 and its foreign counterpart patent claims.
[L42] ***Campylobacter*** **PCR Detection**： This product is sold by Takara Bio Inc. under license from Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd. and Osaka Prefecture University. This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,563,594 and its foreign counterparts.
[L 45] Heated Cover ： This product is covered by the claims of U.S. Patent 5,552,580, and their corresponding foreign counterpart patent claims.
[L47]Real-Time PCR Quantification Method ：The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary *in vitro* diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627, 6,303,305, and 6,503,720, owned by the University of Utah Research Foundation and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH.

その他のライセンス（最新のライセンス情報）に関しては弊社ウェブサイトにてご確認下さい。

●本冊子で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
●タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
●本冊子の内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。
●本冊子に記載されている社名および製品名は、特に記載なくても各社の商標または登録商標です。
●本冊子記載の価格は2015年1月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社
東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
TaKaRa テクニカルサポートライン
TEL 077-543-6116　FAX 077-543-1977
ウェブサイト　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp